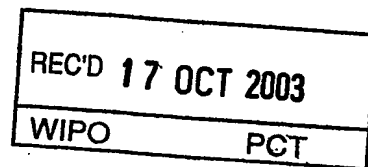


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 44 057.3

Anmeldetag: 10. September 2002

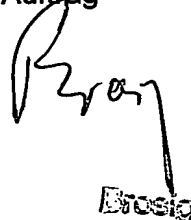
Anmelder/Inhaber: RiNA Netzwerk RNA-Technologien GmbH,
Berlin/DE

Bezeichnung: Verwendung einer Analysensubstanz zur Detektion
eines Explosivstoffes

IPC: C 07 H, G 01 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Brosig

Best Available Copy

3
Albrecht, Lüke & Jungblut

Patentanwälte
Gelfertstr 56, 14195 Berlin

Belegexemplar
Darf nicht geändert werden

DE-Patentanmeldung



102 44 052.3

AT 10.09.2002

Dipl.-Ing. Hans Albrecht
Patentanwalt (1933 - 1979)

Dipl.-Ing. Dierck-Wilm Lüke
Patentanwalt / European Patent Attorney /
European Trademark Attorney

Dipl.-Chem. Dr. Bernhard Jungblut
Patentanwalt / European Patent Attorney /
European Trademark Attorney

Anwaltsakte: RNA/DE/0204

Datum: 10.09.02/*

Anmelder: RiNA Netzwerk RNA-Technologien GmbH
Takustr. 3
D-14195 Berlin

Titel: Verwendung einer Analysensubstanz zur Detektion eines
Explosivstoffes

Erfinder: 1) Dr. Martina RIMMELE, Takustr. 3, D-14195 Berlin
2) Dagmar ORGEL, Takustr. 3, D-14195 Berlin

Priorität: ---

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Verwendung einer Nukleinsäure (1) zur Detektion eines Explosivstoffes (2), wobei die Nukleinsäure (1) spezifisch an eine molekulare Teilstruktur (3) oder molekulare Gesamtstruktur des Explosivstoffes (2) bindet und wobei ein Bindungsereignis zwischen der molekularen Teilstruktur (3) oder der molekularen Gesamtstruktur und der Nukleinsäure (1) detektiert wird, Nukleinsäuren (1) für solche Verwendungen und eine Vorrichtung zur Ausübung der Verwendung. - Fig. 1

15

20

25

30

Verwendung einer Analysensubstanz zur Detektion eines Explosivstoffes

Gebiet der Erfindung

5

Die Erfindung betrifft eine Verwendung einer Analysensubstanz zur Detektion eines Explosivstoffes, wobei die Analysensubstanz spezifisch zumindest an eine molekulare Teilstruktur des Explosivstoffes bindet und wobei ein
10 Bindungsereignis zwischen der molekularen Teilstruktur und der Analysesubstanz detektiert wird, sowie Analysensubstanzen für solche Verwendungen bzw. Verfahren.

Solche Analysensubstanzen können beispielsweise in der
15 Umweltanalytik, speziell der Luft-, Trinkwasser- und/oder Bodenanalytik, aber auch in anderen Bereichen der biochemischen Analytik sowie der medizinischen Diagnostik zum Nachweis von Explosionsstoffen bzw. deren chemischen Hauptkomponenten eingesetzt werden. Auch ist der Einsatz
20 im Rahmen von sicherheitstechnischen Maßnahmen möglich, beispielsweise zur Prüfung auf Anwesenheit von Sprengstoffen in Transportgütern, wie Fluggepäck und dergleichen.

Explosivstoffe im Sinne der DIN 20163 (Sept.1985) sind
25 solche explosionsfähigen Stoffe, die technisch als Sprengstoffe, Treib- und Schießstoffe, Zündmittel, Anzündstoffe oder pyrotechnische Erzeugnisse verwendet werden. Als Sprengstoffe werden lediglich beispielhaft organische Nitro-Verbindungen wie TNT (Trinitrotoluol),
30 Nitramine (Hexogen=RDx=Hexahydro-1,3,5,-trinitro-1,3,5-striazin), Nitrosamine und Pikrinsäure genannt. Aber auch anorganische Substanzen, wie beispielsweise Bleiazid fallen hierunter.

Analysesubstanzen sind Substanzen, die in einem Analyseverfahren zur Bestimmung von Art und Menge eines Stoffes eingesetzt werden, wobei die Menge gebundener

- 5 Analysesubstanz direkt oder indirekt halbquantitativ oder quantitativ bestimmt und hieraus die Menge bzw. Konzentration an Explosivstoff ermittelt und angezeigt wird. Der Begriff der halbquantitativen Bestimmung umfaßt auch eine Information bezüglich des Über- oder Unterschreitens einer
- 10 definierten Grenzmenge gebundener Analysesubstanz und folglich einer hiermit korrelierten Grenzmenge bzw. Grenzkonzentration Explosivstoff (anwesend/abwesend im Falle einer Grenzmenge, welche durch die Detektionsempfindlichkeit bestimmt ist).

15

Ein Bindungsereignis kann jede Form einer (physiko-) chemischen Bindung/Wechselwirkung sein, z.B. ionische Bindung, kovalente Bindung, Van der Waals Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen.

20

- Eine molekulare Teilstruktur kann eine funktionelle Gruppe, eine Kombination mehrerer funktioneller Gruppen, insbesondere benachbarter Gruppen, oder auch ein Kohlenstoffgerüst, mit oder ohne funktionellen Gruppen
- 25 sein. Bezeichnend hierbei ist, dass es sich um einen Ausschnittsbereich eines Moleküls oder einer Verbindung und nicht um das gesamte Molekül handelt. Entsprechendes gilt im Falle anorganischer Sprengstoffmoleküle.

- 30 Die Detektion eines Bindungsereignisses kann mittels optischer, chemischer, biologischer aber auch sonstiger physikalischer bzw. physikalisch-technischer Methoden erfolgen.

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik.

5 Explosivstoffe können einerseits aufgrund der Explosivei-
genschaften ein beachtliches Risiko darstellen. Beispiels-
weise in Sicherheitsbereichen, wie Flughäfen etc., müssen
Explosivstoffe detektiert werden, beispielsweise um uner-
wünschte Handlungen unter Verwendung der Explosivstoffe
10 durch Personen zu verhindern. Andererseits sind Explo-
sivstoffe meist zudem human- und/oder ökotoxisch und es
ist daher wünschenswert, auch geringste Mengen in Boden
oder Wasserproben, auch in Aerosolen, nachweisen zu kön-
nen, vorzugsweise einschließlich der Detektion des spezi-
15 fischen, vorgefundenen Explosivstofftyps. Letztes ist von
besonderer Bedeutung beispielsweise im Rahmen von Konver-
sionsmaßnahmen an stillgelegten militärischen Einrichtungen.
Schließlich ist es in der Forensik oft nötig,
Explosivstoffspuren nachzuweisen und den Explosivstofftyp
20 zu identifizieren.

Aus der Praxis sind verschiedenste klassische (nass-)
chemische Analysenmethoden bekannt. Diese sind in der An-
wendung aufwendig, benötigen ein Labor (on site Messungen
25 sind in aller Regel nicht möglich) und liefern keine
schnellen Ergebnisse. Zudem befriedigen die erreichbaren
Nachweisgrenzen nicht. Proben müssen vorher ggf. aufwändig
aufkonzentriert werden, um die hohe Nachweisgrenze dieser
Testsysteme unterschreiten zu können. Eine solche Auf-
30 onzentrierung von Proben ist zusätzlich zeitaufwendig und
kostenintensiv. Zudem weisen die insofern bekannten Test-
systeme Kreuzempfindlichkeiten zu weiteren, in den Proben
enthaltenen Stoffen auf.

Ein faseroptischer Biosensor zur Detektion von TNT basierend auf einem Immunoassay unter Verwendung einer fluoreszierenden Detektorverbindung, nämlich Antikörper, ist aus der Literaturstelle Craig, H. et al, Field Demonstration of On-Site Analytical Methods for TNT and RDX in Ground Water, Proceedings of the HSRC/WERC Joint Conference on the Environment, May 1996, bekannt. Damit ausführbare Verfahren erfassen Explosivstoffe quantitativ
10 allenfalls unzureichend; problematisch ist auch die Kreuzreaktivität von Antikörpern mit anderen Stoffen.

Des weiteren ist es aus der Praxis bekannt, zum Nachweis von Explosivstoffen Gas- oder Flüssigkeitschromatographie
15 anzuwenden. Hierfür notwendige Meßgeräte sind nicht on-site einsetzbar.

In einem fachfremden technologischen Gebiet ist ein Biosensor unter Verwendung eines immobilisierten, fluoreszenzmarkierten Aptamers zur Detektion von Thrombin beschrieben (Potyrailo, RA et al, Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors, Analytical Chemistry, 70, 3419-3425, 1998). Ein weiterer Biosensor zur Detektion von Thrombin ist in der Literaturstelle Lee,
20 M. et al, A Fiber-Optic Microarray Biosensor Using Aptamers as Receptors, Analytical Biochemistry, 282, 142-146, 2000 offenbart. Diese Literaturstelle beschreibt die Verwendung eines auf Mikroglaskugeln immobilisierten Aptamers zur Detektion von Thrombin.

30

Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein Verfahren zur Detektion von Explosivstoffen, mittels welchem Explosivstoffe mit verbesserter Empfindlichkeit und Spezifität nachgewiesen werden können und welches die Bestimmung von Explosivstoffen im Feldeinsatz ermöglicht, sowie Analysensubstanzen hierfür anzugeben.

Grundzüge der Erfindung

- 10 Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure zur Detektion eines synthetischen Explosivstoffes, wobei die Nukleinsäure spezifisch an eine molekulare Teilstruktur oder die molekulare Gesamtstruktur des Explosivstoffes bindet und wobei ein
- 15 Bindungsereignis zwischen der molekularen Teilstruktur oder der molekularen Gesamtstruktur und der Nukleinsäure detektiert wird.
- 20 Eine Nukleinsäure im Sinne der Erfindung kann als Nukleotidsequenz eine RNA, DNA oder eine PNA enthalten, welche auch derivatisierte nicht-natürliche Nukleotide aufweisen kann. Neben der Nukleotidsequenz kann eine Nukleinsäure aber auch Moleküle enthalten, beispielsweise
- 25 endständig der Nukleotidsequenz gebunden, welche keine Nukleotide enthalten. Die Nukleinsäure kann insbesondere ein Aptamer sein. Ein Aptamer ist eine Nukleinsäure, welches analog einer Antikörper/Antigenaffinität ("Schlüssel/Schloss") oder gemäß dem Bindungsmodell des
- 30 induced fit eine Bindungsaffinität zu bestimmten Zielstrukturen auf molekularer Ebene aufweist. Das Oligonukleotid kann auch ein Spiegelmer sein. Ein Spiegelmer ist eine spiegelbildliche, hochaffine Nukleotidsequenz, welche

aus L-Ribose bzw. L-2'-Desoxyribose Einheiten aufgebaut ist.

Mit der Erfindung wird gegenüber den klassischen Analyse-
5 methoden erreicht, dass eine extrem niedrige Nachweis-
grenze für die Detektion von Explosivstoffen erhalten und
damit die Empfindlichkeit des Testsystems zur Detektion
von Explosivstoffen erhöht wird. Ein der Messung vorge-
schalteter Anreicherungsschritt zur Aufkonzentrierung der
10 Explosivstoffe ist aufgrund der hohen Nachweisempfin-
dlichkeit nicht notwendig und entfällt. Vorteilhaft
gegenüber der Antikörpertechnologie ist (neben der
besseren Empfindlichkeit und der on-site Anwendbarkeit),
daß Aptamere vollständig in vitro identifizierbar
15 (beispielsweise mittels theoretischer 3-dimensionaler
Strukturberechnungen) und herstellbar sind und folglich
keine Versuchstiere für Immunisierungszwecke benötigt wer-
den. Dennoch wird eine Spezifität erreicht, welche jenen
der Antikörpertechnologie zumindest ebenbürtig, gegenüber
20 der klassischen Analytik weit überlegen ist.

Die Erfindung lehrt weiterhin die in den Aus-
führungsbeispielen angegebenen Sequenzen für den Einsatz
in einem erfindungsgemäßen Verfahren.
25

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß Nukleinsäuren
nach Maßgabe ihrer Selektivität bzw. Affinität zu einem
Zielmolekül auffinden lassen. Dabei können sich gefundene
Nukleotidsequenzen um eine molekulare Teilstruktur, insbe-
30 sondere im Falle kleiner Zielmoleküle aber auch um eine
molekulare Gesamtstruktur gleichsam herumfalten, während
andere Nukleotidsequenzen diese Fähigkeit nicht oder in

nur vermindertem Maße aufweisen und im Rahmen eines Screenings verworfen werden.

5 Detaillierte Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen

Die molekulare Teilstruktur des Explosivstoffes kann unmittelbar an ein Stickstoffatom gebundenen, disponiblen Sauerstoff tragen und aus der Gruppe bestehend aus "Nitrите, Nitrate, Nitro- und Nitrosoverbindungen" ausgewählt sein. Der Explosivstoff kann aus der Gruppe bestehend aus "Nitrobenzolderivate, TNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2-NT, Pikrinsäure, Hexogen, Octogen, Hexyl, Tetryl, Ethylenglykoldinitrat, Diethylenglykoldinitrat, Nitroglycerin, Nitropenta sowie Derivate solcher Verbindungen" ausgewählt sein.

Die Nukleinsäure kann ausgewählt sein aus der Gruppe "Sequenzen der Figuren 8 und 9 oder beliebige Fragmente dieser Sequenzen, sofern diese Fragmente zumindest 6, 10 oder 15 fortlaufende Nukleotide aus einer solchen Sequenz aufweisen". Bevorzugt sind markierte (Unterstreichungen in Fig 8) Konsensussequenzen enthaltende Nukleinsäuren. Die Nukleinsäure kann direkt an einer Festkörperoberfläche, alternativ indirekt über eine Spacerverbindung an der Festkörperoberfläche, immobilisiert sein. Eine Spacerverbindung ist ein Verbindungsmolekül zwischen einer Festkörperoberfläche und einer Nukleinsäure bzw. einem Aptamer. Die Spacerverbindung kann eine Linker-Nukleinsäure, beispielsweise ein kurzer synthetischer DNA-Doppelstrang, sein; es sind aber auch beliebige andere langgestreckte organische Moleküle, typischerweise Oligomere oder Polymere, geeignet. Des weiteren ist auch Bindung über übliche Affinitätspaare, wie beispielsweise

1 Biotin/Streptavidin, möglich, wobei ein Molekül des Affinitäts-
2 paars mit der Nukleinsäure verbunden ist und das
3 Komplementmolekül immobilisiert ist. Die Festkörperober-
4 fläche kann im Rahmen einer optischen Fiber oder Faser
5 eingerichtet sein. Es versteht sich, dass auch mehrere
6 verschiedene Nukleinsäurespezies auf der Oberfläche oder
7 Faser immobilisiert sein können. In diesem Fall können
8 verschiedene Explosivstofftypen, welche jeweils an die
9 respektiven Nukleinsäurespezies spezifisch binden,
10 gleichzeitig detektiert werden.

11 Das Bindungsereignis kann durch Messung eines Signals
12 eines (direkt oder indirekt) markierten und von einem
13 Molekül des Explosivstoffes aus der Bindung mit der Nuk-
14 leinsäure kompetitiv verdrängten Detektormoleküls detek-
15 tiert werden. Insbesondere kommt eine Fluoreszenzmar-
16 kierung des Detektormoleküls in Frage. Eine Fluor-
17 eszenzmarkierung ist eine Markierung mit einem
18 Fluorochrom. Ein Fluorochrom kann beispielsweise Fluo-
19 rescin, Acridinorange oder andere gebräuchliche Fluoro-
20 chrome, wie Cy5, Cy3, usw., sein. Das Signal kann durch
21 Abnahme der Signalintensität gebundener Detektormoleküle
22 oder durch Zunahme der Signalintensität freigesetzter
23 (verdrängter) Detektormoleküle gebildet werden. Im Falle
24 von kooperativen Effekten, wie beispielsweise Stacking,
25 kann auch eine Zunahme der Signalintensität gebundener
26 Detektormoleküle erfolgen, oder beispielsweise durch FRET-
27 Methoden. Im Falle des simultanen Einsatzes verschiedener
28 Nukleinsäurespezies kann es sich empfehlen, für die
29 jeweiligen Nukleinsäurespezies verschieden markierte De-
30 tektormoleküle vorzusehen, damit zwischen Signalen von
31 verschiedenen Nukleinsäurespezies diskriminiert werden
32 kann.

Die Erfindung lehrt desweiteren eine Vorrichtung zur Detektion eines Explosivstoffes, wobei die Vorrichtung mit einer für eine molekulare Teilstruktur des Explosivstoffes spezifischen Nukleinsäure ausgestattet ist. Die Nukleinsäure kann direkt oder alternativ über eine Spacerverbindung an einer Festkörperoberfläche vorzugsweise einer optischen Faser oder Fiber immobilisiert sein. Bevorzugt ist, dass die Vorrichtung Mittel zur Detektion eines Bindungsereignisses zwischen der molekularen Teilstruktur und der Nukleinsäure beispielsweise einen Fluoreszenzdetektor aufweist. In der Vorrichtung kann eine Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung der Detektormoleküle eingerichtet sein, wobei die optische Faser oder Fiber an einen Fluoreszenzdetektor angeschlossen sein sollte. Desweiteren können Mittel zur Zuführung einer Probe zu der Nukleinsäure integriert sein. Im Falle der Detektion von Sprengstoffen im sicherheitstechnischen Bereich kann beispielsweise eine Luftprobe aus der Umgebung zu überprüfender Gegenstände entnommen und analysiert werden. Dabei kann die Luftprobe vor der Detektion zunächst in eine flüssige Phase eingebracht werden in welcher dann eine Detektion, wie beschrieben erfolgt. Es ist aber auch eine Detektion in der Gasphase möglich, wobei beispielsweise erfindungsgemäß eingesetzte Nukleinsäuren und/oder Detektormoleküle als Aerosol mit der Gasprobe kontaktiert werden können. Die Nukleinsäure kann mit einem fluoreszenzmarkierten Detektormolekül beladen sein, wobei die Bindungsstärke zwischen der Nukleinsäure und dem Detektormolekül niedriger als die Bindungsstärke zwischen der Nukleinsäure und der molekularen Teilstruktur sein sollte. Ein Teil der optischen Faser oder Fiber kann in einem Probengas- oder Flüssigkeitsraum, in welchen eine

Gas- oder Flüssigkeitsprobe einbringbar ist, angeordnet sein. Die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes liegt vorzugsweise in einem Bereich kleinerer Wellenlängen als die Wellenlänge des emittierten Lichtes des Markers..

5 Hierbei kann es sich um Wellenlängen des Fluoreszenzbereiches handeln. Der Lichteintrag kann über die optische Fiber oder Faser, über deren Manteloberfläche aber auch über eine oder beide Stirnflächen, erfolgen. Gleiches gilt für die Auskoppelung des emittierten Lichtes (Fluo-

10 reszenzsignal). Die optische Fiber oder Faser kann drehbar gelagert sein. Generell ist es selbstverständlich, daß emittiertes Licht nicht direkt detektiert wird, sondern indirekt über Emissionen von Molekülen, die ihrerseits durch das emittierte Licht angeregt werden. In dieser

15 Weise ist auch eine optische Verstärkung einrichtbar.

Es versteht sich, dass die Detektion der Verdrängung des Markers auch in anderer Weise, z.B. mittels eines elektrochemischen Sensors erfolgen kann. Auch kann die in direk-

20 ter Proportionalität zur Analytmenge stehende Konzentration des nichtgebundenen Markers mit einem beispielsweise elektro-enzymatischem Verstärkersystem quantifiziert werden. Hierdurch können erhöhte Empfindlichkeiten des Testsystems erreicht werden.

25

Ein mobiles Meßgerät auf Basis der Faseroptik kann mit einer tragbaren Stromquelle, z.B. einer Batterie, betrieben werden. Zur Aufzeichnung und Auswertung der Meßsignale kann das Meßgerät mit einem elektronischen Bauteil

30 beispielsweise einem Rechner ausgestattet sein und zur Förderung einer Gas- oder Flüssigkeitsprobe eine Fördereinrichtung, beispielsweise eine Schlauchpumpe, aufweisen.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich ein Ausführungsbeispiel darstellenden Figuren näher erläutert. Es zeigen:

5

Fig. 1: Anlagerung eines exemplarisch dargestellten Explosivstoffes an ein über eine Spacerverbindung immobilisiertes Aptamer

10 Fig. 2: ein über eine Spacerverbindung an eine optische Faser oder Fiber immobilisiertes Aptamer, beladen mit einem fluoreszenzmarkiertem Detektormolekül - vor Kontakt mit einer Explosivstoff haltigen Probe, im Dunkeln ohne Lichteinstrahlung.

15

Fig. 3: ein über eine Spacerverbindung an eine optische Faser oder Fiber immobilisiertes Aptamer, beladen mit einem fluoreszenzmarkiertem Detektormolekül - vor Kontakt mit einer Explosivstoff haltigen Probe, Lichteinstrahlung. Die optische Fiber oder Faser leitet das vom Fluorochrom emittierte Licht innerhalb der optischen Faser oder Fiber.

20

Fig. 4: ein über eine Spacerverbindung an eine optische Faser oder Fiber immobilisiertes Aptamer, beladen mit einem fluoreszenzmarkiertem Detektormolekül - nach Kontakt mit einer Explosivstoff haltigen Probe, im Dunkeln ohne Lichteinstrahlung. Der Explosivstoff hat einige Detektormoleküle verdrängt und ist am Aptamer gebunden.

25

30

Fig. 5: ein über eine Spacerverbindung an eine optische Faser oder Fiber immobilisiertes Aptamer, beladen

Ak

mit einem fluoreszenzmarkiertem Detektormolekül -
nach Kontakt mit einer Explosivstoff haltigen
Probe, Lichteinstrahlung. Der Explosivstoff hat
einige Detektormoleküle verdrängt und ist am Ap-
tamer gebunden. Die optische Fiber oder Faser
leitet das vom Fluorochrom emittierte Licht inner-
halb der optischen Faser oder Fiber. Die Emission
ist geringer als in Fig. 2, da weniger Fluoro-
chrome angeregt wurden.

10

Fig. 6: eine schematische Darstellung einer erfindungs-
gemäßen Vorrichtung

15

Fig. 7: Vergleichsversuche zur Bindungsstärke mit einem
Aptamer gegenüber einem Antikörper in einem
Immunverfahren

Fig. 8a bis 8h: erfindungsgemäße Aptamersequenzen

20 Fig. 9: erfindungsgemäße Konsensus-Sequenzen

In Figur 1 erkennt man eine Nukleinsäure 1 zur Detektion
eines synthetischen Explosivstoffes 2, wobei die Nuklein-
säure 1 spezifisch an eine molekulare Teilstruktur 3 des
Explosivstoffes 2 bindet. Es handelt sich bei dem Explo-
sivstoff 2 um TNT. Geeignete Nukleinsäuren 1 sind in den
Figuren 8 bis 9 dargestellt.

30 Die Figuren 2 bis 5 zeigen den Detektionsmechanismus für
Explosivstoffe. Die Nukleinsäure 1 ist über eine Spac-
erverbindung 6, an einer Festkörperoberfläche 7, beispiel-
sweise der Oberfläche einer optischen Fiber oder Faser 8,

immobilisiert. Figur 2 stellt die Beladung der Nukleinsäure 1 mit einem fluoreszenzmarkierten 4 Detektormolekül 5 und Figur 3 die Detektion eines Bindungsereignisses durch Messung eines Signals eines fluoreszenzmarkierten 4 5 Detektormoleküls 5 dar. Die Verdrängung des Detektormoleküls 5 aus der Bindung mit der Nukleinsäure 1 durch ein Molekül des Explosivstoffes 2 ist in Figur 4 dargestellt. In Figur 5 ist dargestellt, dass das Signal durch Abnahme der Signalintensität gebundener Detektor-
10 moleküle 5 gebildet wird.

In Figur 6 in Zusammenschau mit Figur 1 und 5 erkennt man eine Vorrichtung zur Detektion eines Explosivstoffes 2 mit einer für eine molekulare Teilstruktur 3 des Explosivstoffes 2 spezifischen Nukleinsäure 1. Die Nukleinsäure ist an einer Festkörperoberfläche 7 immobilisiert. Die Nukleinsäure 1 ist über eine Spacerverbindung 6 an einer optischen Faser 8 oder Fiber immobilisiert und mit einem fluoreszenzmarkierten 4 Detektormolekül 5 beladen. Es ist
20 eine Lichtquelle 11 zur Fluoreszenzanregung der Detektormoleküle 5 eingerichtet, wobei die optische Faser 8 oder Fiber an einen Fluoreszenzdetektor 9 angeschlossen ist und ein Teil der optischen Faser 8 oder Fiber in einem Proben- gas- oder Flüssigkeitsraum 12, in welchen eine Gas- oder
25 Flüssigkeitsprobe 13 einbringbar ist, angeordnet ist. Ein mobiles Meßgerät auf Basis der Faseroptik kann mit einer tragbaren Stromquelle 14, z.B. einer Autobatterie, betrieben werden. Zur Aufzeichnung und Auswertung der Meßwerte kann das Meßgerät mit einem elektronischen Bauteil
30 beispielsweise einem Rechner 15 ausgestattet sein und zur Förderung der Gas- oder Flüssigkeitsprobe eine Fördereinrichtung 16 beispielsweise eine Schlauchpumpe aufweisen.

Zum Auffangen der Probe kann ein Auffangbehälter 17 eingerichtet sein.

In der Figur 7 sind Vergleichsversuche zur Bindungsstärke 5 dargestellt. Es sind gezeigt Bindungsuntersuchungen TNT/erfindungsgemäße Nukleinsäure gegenüber TNT/Antikörper. Die Dissoziationskonstante der Aptamerreaktion liegt bei ca. $k_D = 10^{-8}$, jene der Antikörperreaktion bei lediglich ca. $k_D = 10^{-5}$.

10.

Es ist gleichsam in Umkehrung der vorstehenden Verfahrensweise auch möglich, daß Sprengstoffmoleküle an der Festphase (z.B. in einer Durchflusszelle angeordnete 15 Lichtleitfaser mit angeschlossenem Detektor für das von einem Fluorophoren auf Anregung mittels beispielsweise einer Leuchtdiode emittierten Lichtes) immobilisiert und mittels der markierten Nukleinsäure ein Signal erzeugt wird. Diese Umkehrung kann nicht nur einer eigentlichen Messung dienen, (die an der Festphase gebundene Nukleinsäuremenge nimmt gleichgewichtsbedingt ab, wenn in der 20 Flüssig- oder Gasphase Sprengstoffmoleküle anwesend sind), sondern es können auch Eichkurven erstellt werden oder Nukleinsäuren auf die erfindungsgemäße Eignung geprüft werden.

25

Erfindungsgemäße geeignete Nukleinsäure- bzw. Aptamersequenzen sind in Figur 8a bis 8h sowie in Figur 9 angegeben. Dabei sind markierte Bereiche (unterstrichene Teilsequenzen) bzw. Konsensusbereiche (jeweils einzeln für 30 sich oder verbunden über eine beliebige Anzahl Nukleotide) jeweils von selbstständiger Bedeutung. Figur 9 zeigt Variationen der Aptamer-Konsensus-Sequenzen; es sind die in den Spalten angegebenen Austauschmöglichkeiten für

Nukleotide vorgesehen. Die vorstehenden Sequenzen sind
auch in den Sequenzprotokollen wiedergegeben.

5

10

15

20

25

30

Patentansprüche:

1. Verwendung einer Nukleinsäure (1) zur Detektion eines Explosivstoffes (2), wobei die Nukleinsäure (1) spezifisch an eine molekulare Teilstruktur (3) oder an die molekulare Gesamtstruktur des Explosivstoffes (2) bindet und wobei ein Bindungsereignis zwischen der molekularen Teilstruktur (3) oder der molekularen Gesamtstruktur und der Nukleinsäure (1) detektiert wird.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die molekulare Teilstruktur (3) unmittelbar an ein Stickstoffatom oder an mehrere Stickstoffatome gebundenen disponiblen Sauerstoff trägt.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei die molekulare Teilstruktur (3) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Nitrite, Nitrate, Nitro- und Nitrosoverbindungen".
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Explosivstoff ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Nitrobenzolderivate, TNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2-NT, Pikrinsäure, Hexogen, Octogen, Hexyl, Tetryl, Ethylenglykoldinitrat, Diethylenglykoldinitrat, Nitroglycerin, Nitropenta sowie Derivate solcher Verbindungen".
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäure (1) ausgewählt ist aus der Gruppe

"Sequenzen der Figuren 8 und 9 oder beliebige Fragmente dieser Sequenzen mit einer Länge von zumindest 6, insbesondere zumindest 10, Nukleotiden".

5

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei ein Bindungsereignis durch Messung eines Signals eines markierten, insbesondere fluoreszenzmarkierten (4), und von einem Molekül des Explosivstoffes (2) aus der Bindung mit der Nukleinsäure (1) kompetitiv verdrängten Detektormoleküls (5) detektiert wird.

10

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Nukleinsäure (1), optional über eine Spacerverbindung (6), an einer Festkörperoberfläche (7), insbesondere die Oberfläche einer optischen Fiber oder Faser (8), immobilisiert ist.

15
20

8. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7, wobei das Signal durch Abnahme oder Zunahme der Signalintensität gebundener Detektormoleküle (5) gebildet ist.

25

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei das Signal durch Zunahme der Signalintensität freigesetzter Detektormoleküle (5) gebildet ist.

30

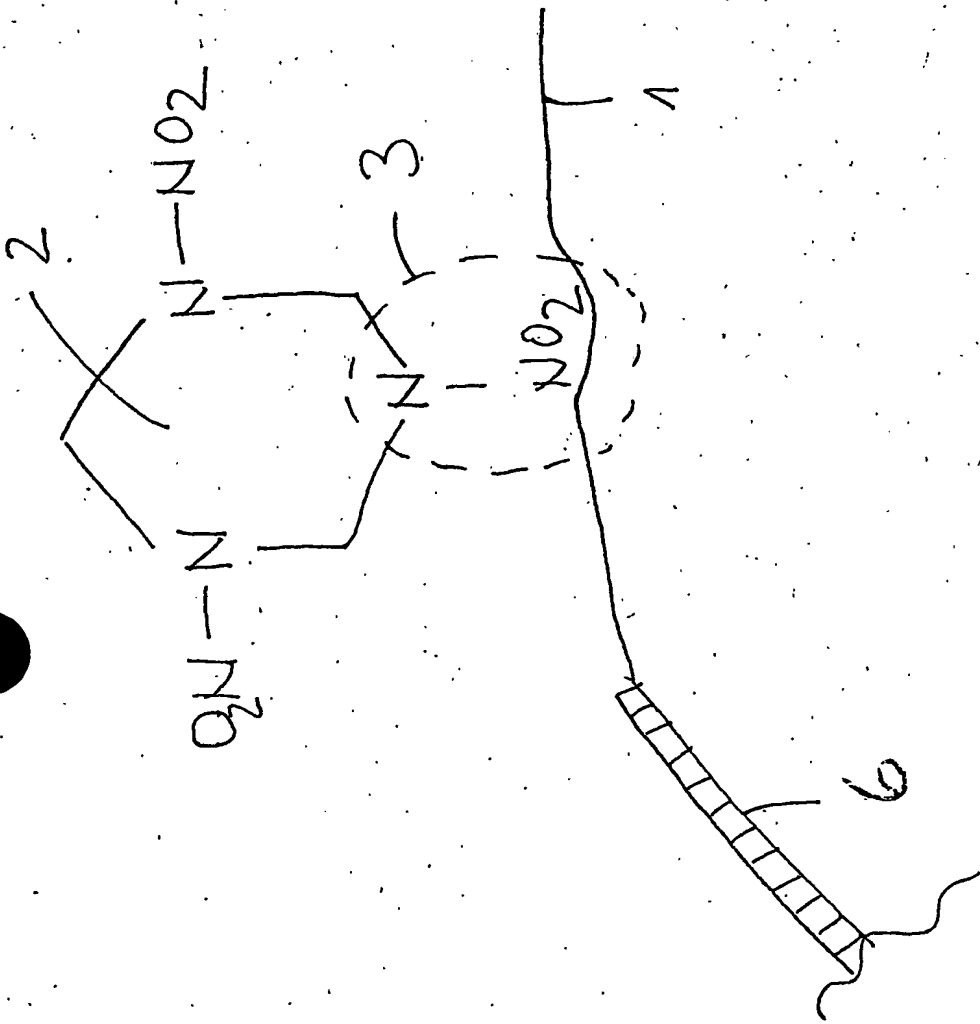
10. Nukleinsäure (1) zur Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 gemäß einer der Sequenzen der Figuren 8 oder 9 oder beliebige Fragmente dieser Sequenzen mit

einer Länge von zumindest 6, insbesondere zumindest 10, Nukleotiden.

- 5 11. Vorrichtung zur Detektion eines Explosivstoffes (2)
mit einer für eine molekulare Teilstruktur (3) des
Explosivstoffes (2) spezifischen Nukleinsäure (1),
vorzugsweise an einer Festkörperoberfläche
(7) immobilisiert, mit Mitteln zur Detektion eines
10 Bindungsereignisses (9) zwischen der molekularen Teil-
struktur (3) und der Nukleinsäure (1) und mit Mitteln
zur Zuführung einer Probe (10) zu der Nukleinsäure (1).
- 15 12. Vorrichtung nach Anspruch 11, wobei die Nukleinsäure
(1) über eine Spacerverbindung (6) an einer optischen
Faser (8) oder Fiber immobilisiert ist, wobei die Nuk-
leinsäure (1) mit einem fluoreszenzmarkierten (4) De-
tektormolekül (5) beladen ist, wobei die
20 Bindungsstärke Nukleinsäure (1)/Detektormolekül (5)
niedriger als die Bindungsstärke Nukleinsäure
(1)/molekulare Teilstruktur (3) ist, wobei eine Li-
chtquelle (11) zur Fluoreszenzanregung der Detektor-
moleküle (5) eingerichtet ist, wobei die optische
25 Faser (8) oder Fiber an einen Fluoreszenzdetektor (9)
angeschlossen ist und wobei zumindest ein Teil der
optischen Faser (8) oder Fiber in einem Probengas-
oder Flüssigkeitsraum (12), in welchen eine Gas- oder
Flüssigkeitsprobe (13) einbringbar ist, angeordnet
30 ist.

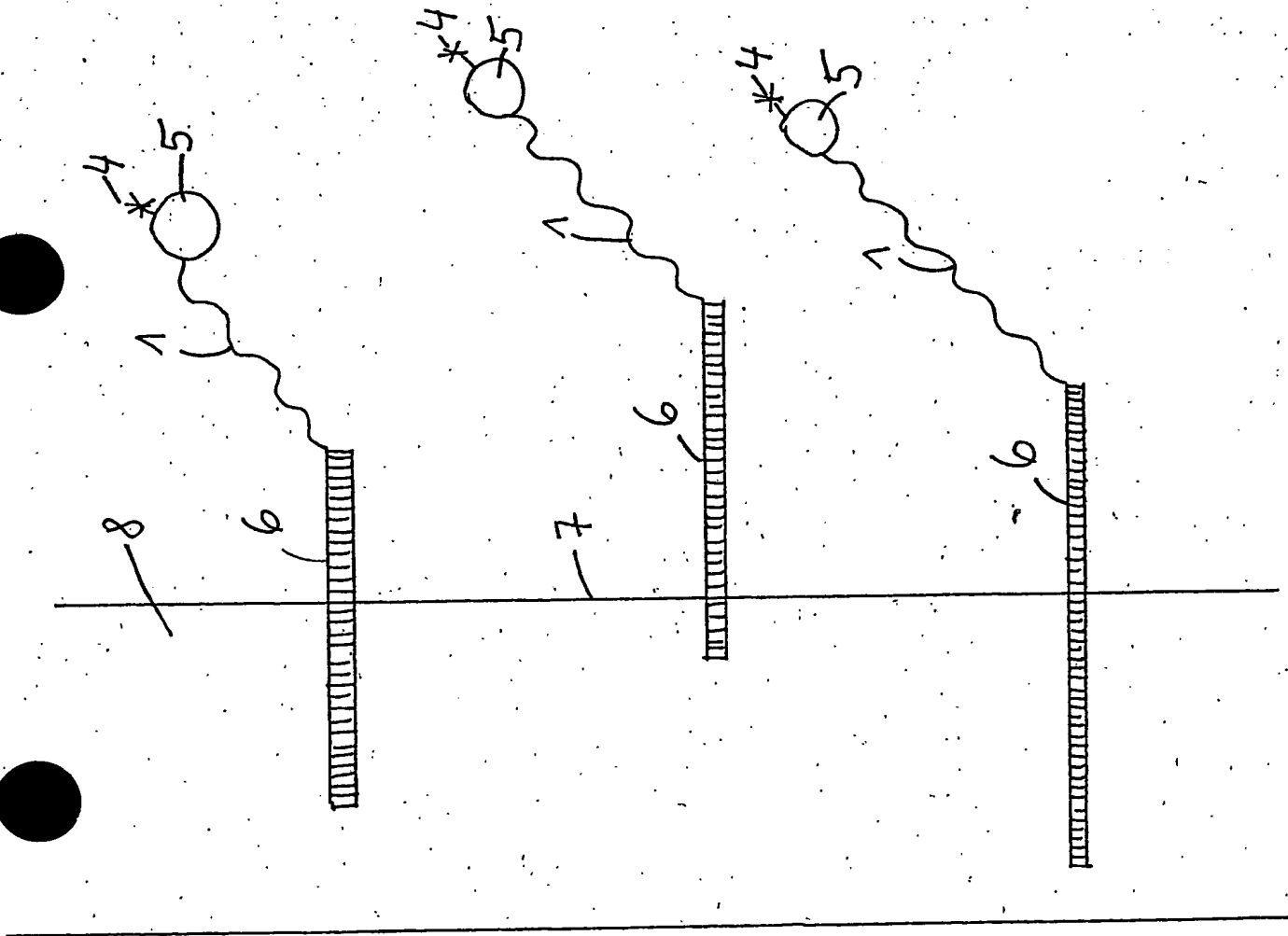
1

Fig.



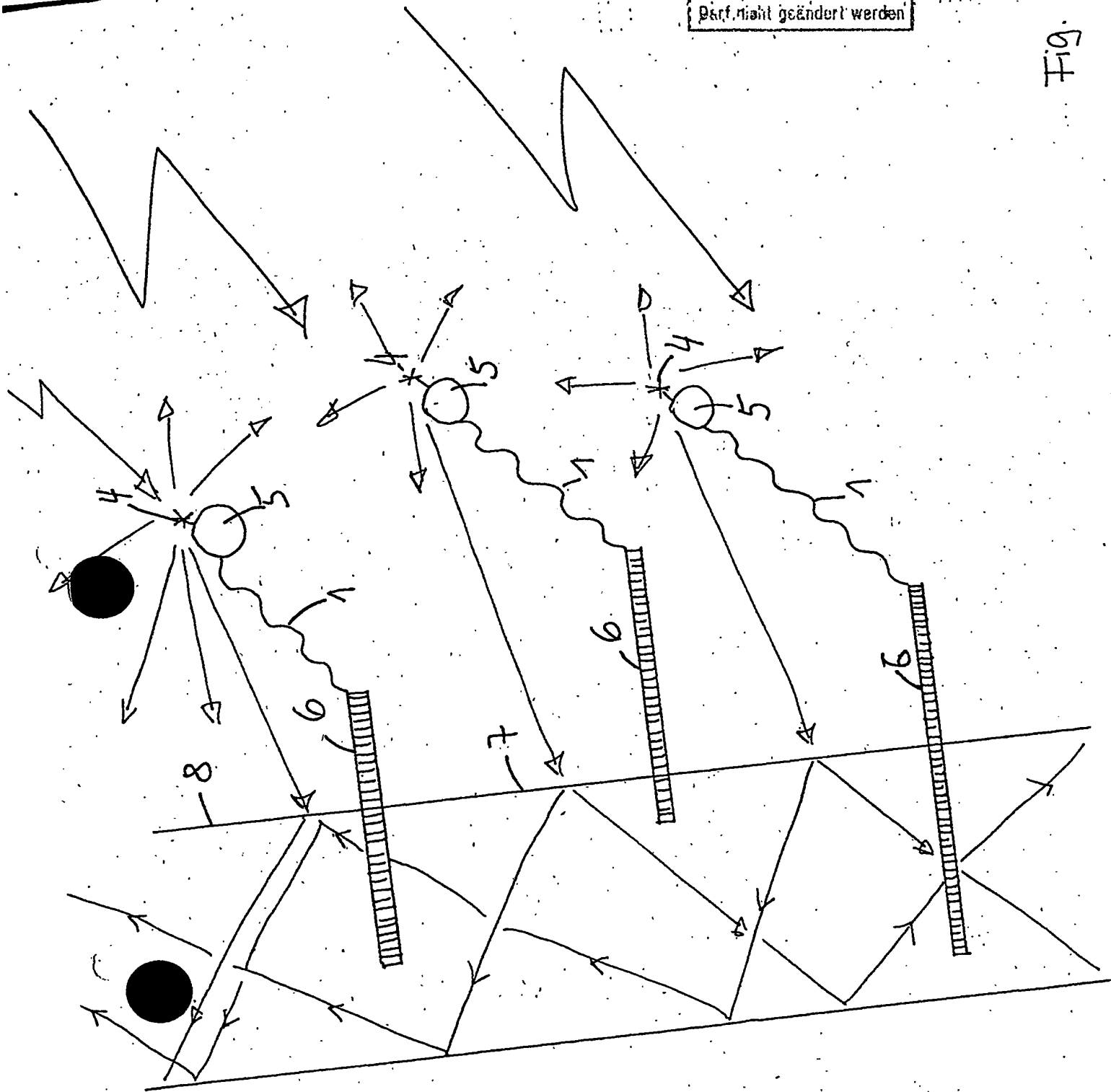
Beispiel
Darf nicht geändert werden

Fig. 24



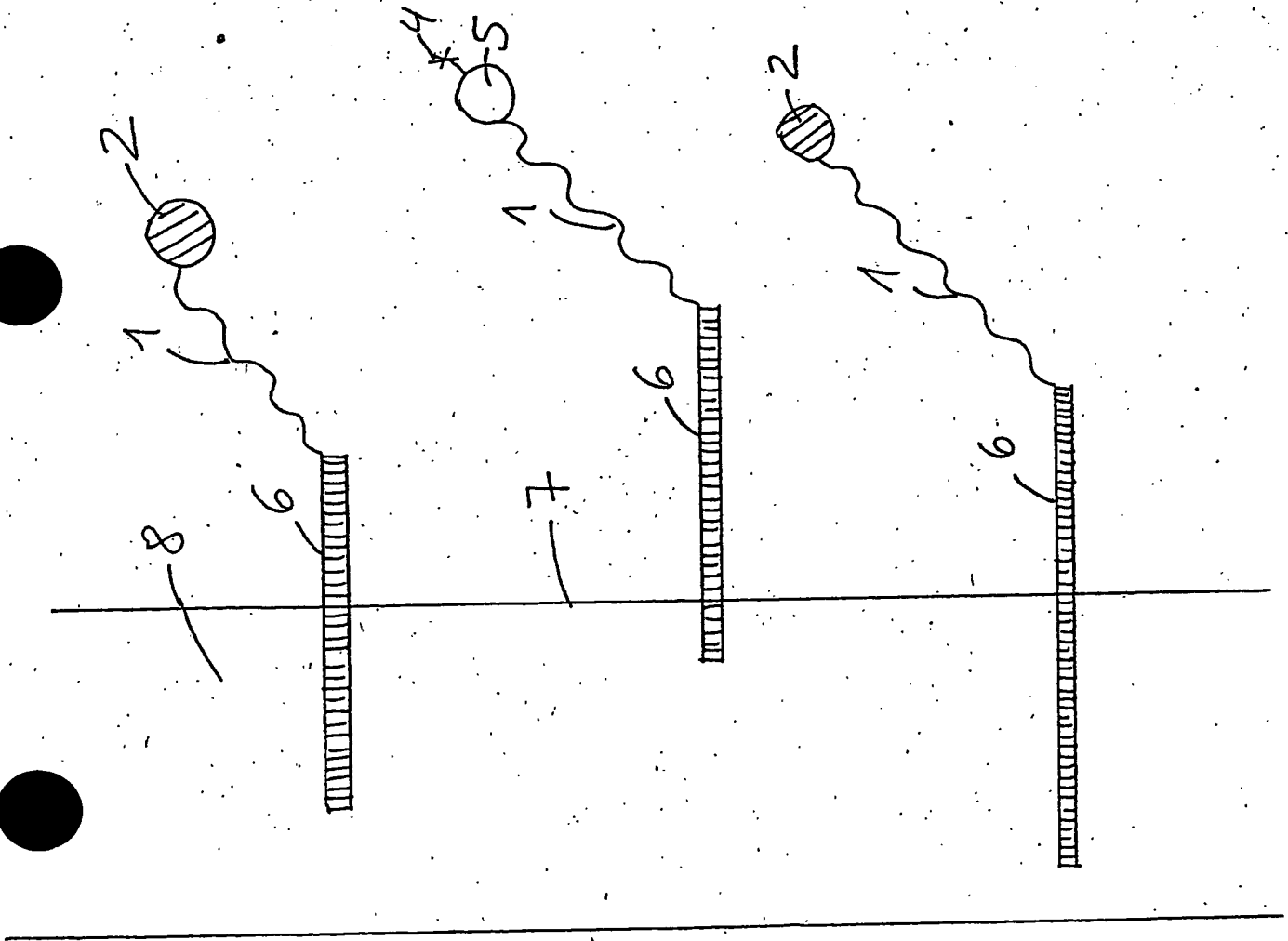
Belegexemplar
Part, nicht geändert werden

25
m
H



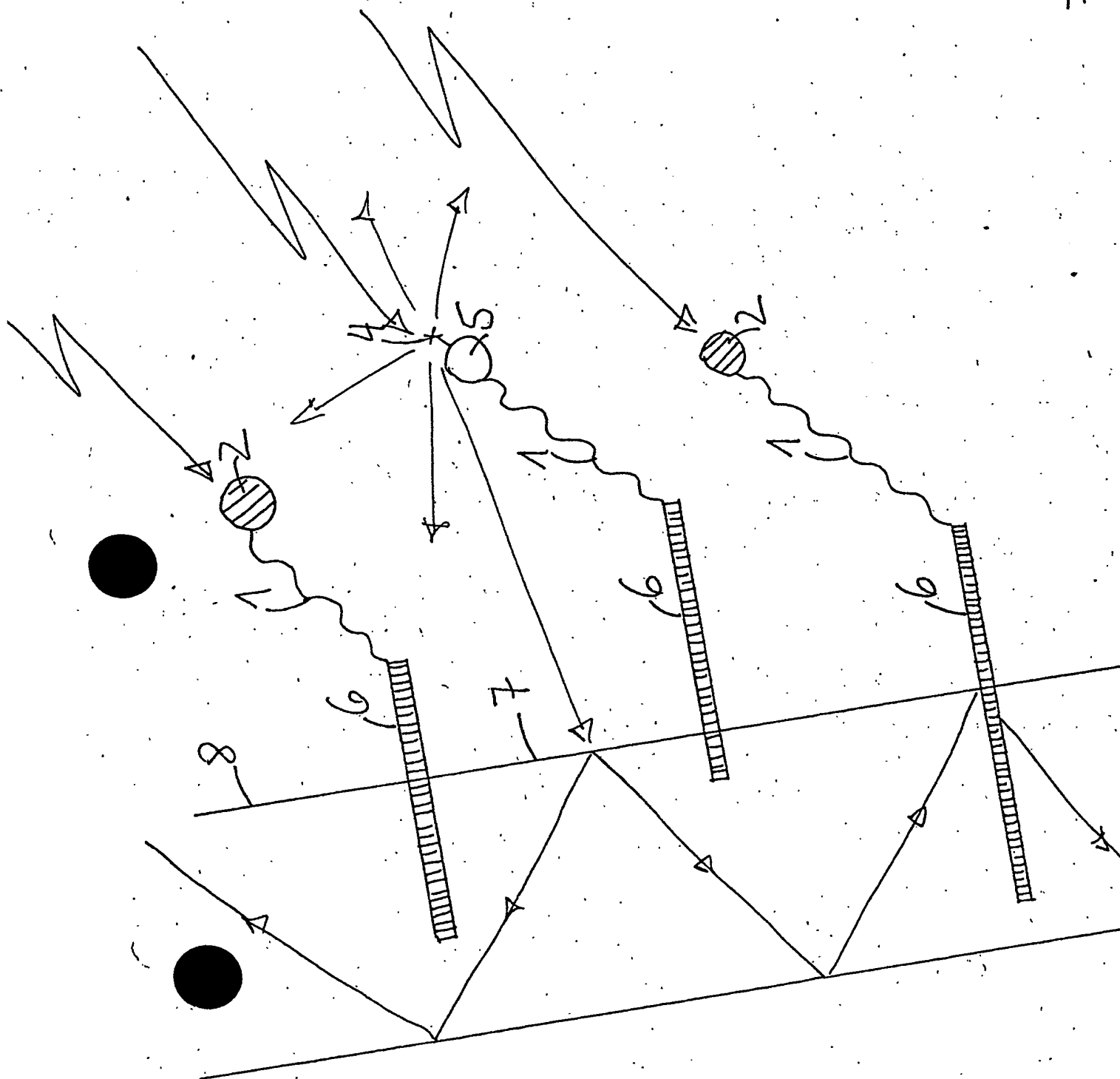
Selektionsplan
Das Diagramm ist zu lesen.
werden

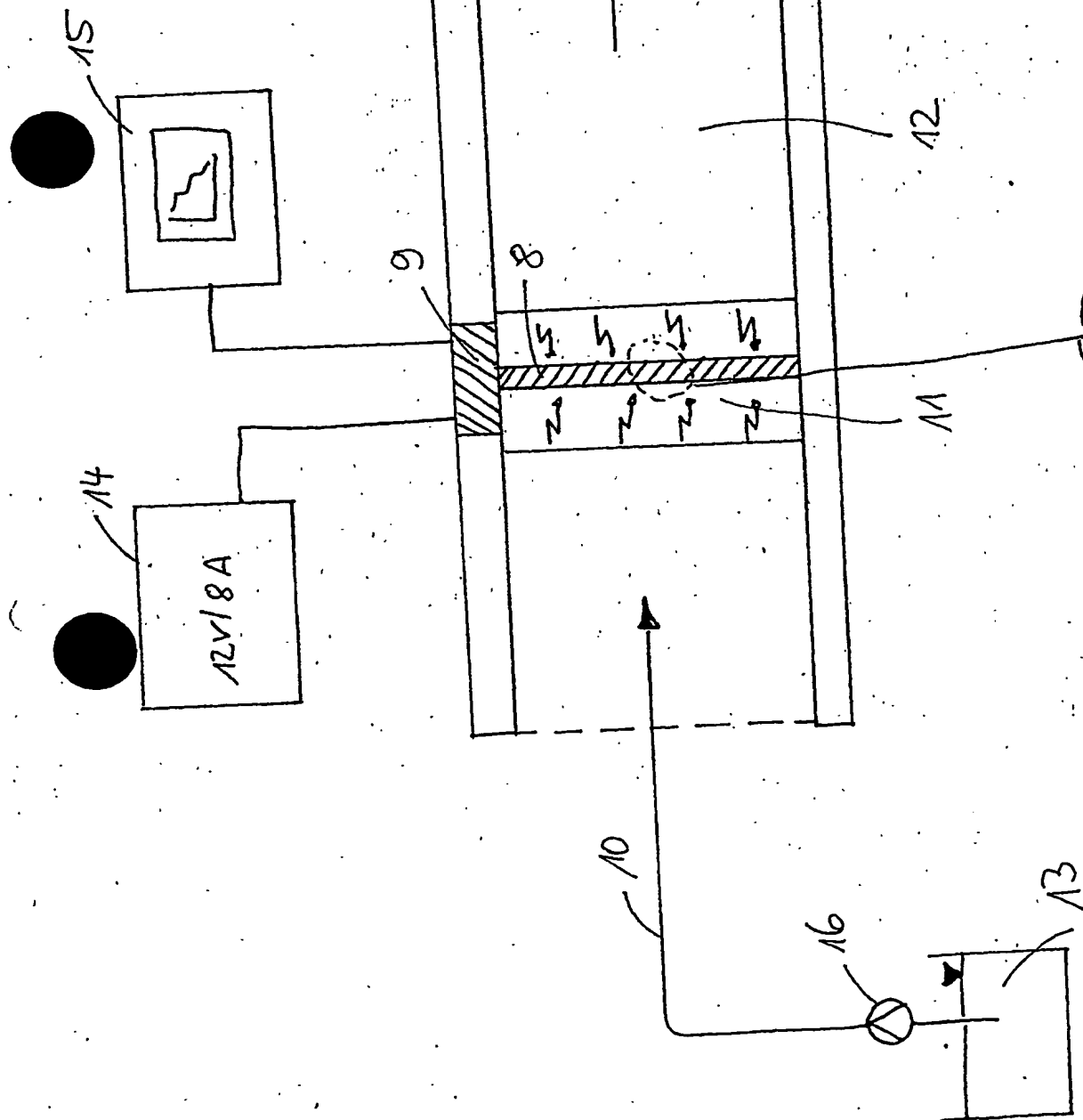
Fig. 4 26



Belegexemplar
Darf nicht geändert werden

271
5
Fig.





(Siehe Fig. 1 u. 5)

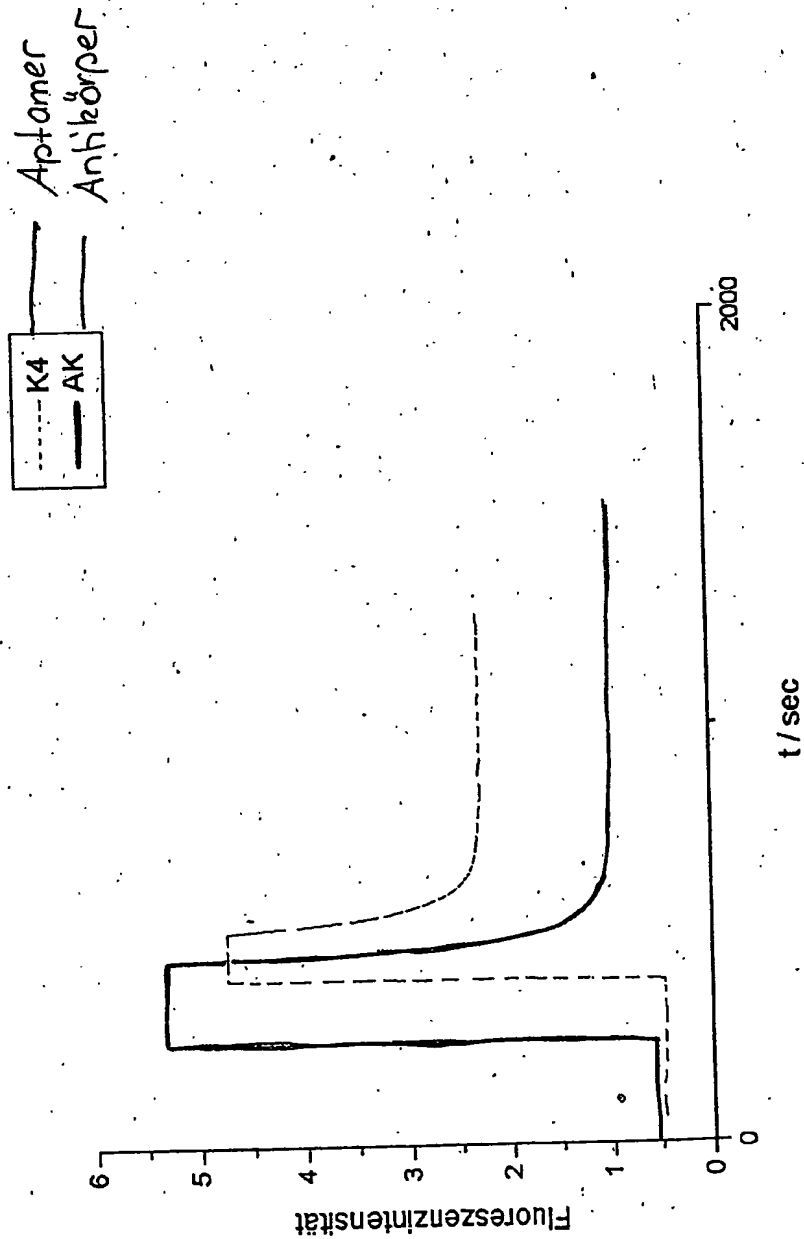


Fig. 7

Konsensus Sequenzen: C AUA CCGC. G GCG
GA AUUAC GGG C
CU C
U A
A

CUCGCAGUC

CAUGUGUGCU G

Einzelne RNA-Klone

RNA
Primersequenzen
A GGGAUUCGAGCUCGGUACC
B CUGCAGGCAUGCAGCUUGG

DO1-3: A
AU⁷CGCGACAUACGAUGGUAUGCAUGCAUACCGCUUCCAUUACGAACAUAUGACGAACCGUCCGAUAGUGGGCAGGUGAUACUGCCAGCCCUUGGAGCGG

DO1-5
CUUAANUGGACUGACACUACACACGGACCGCUCAGUAGACCAUUUUUCAAGGCGCUCGCAGUCCACGUCGGUCCUGGGCAUUUGUCCCCC

DO1-5a
GUGUUGACNCUUUACCCAGCCAUUGCUAAUUGGUUCCUCCAGCGCCCUAUCGGAACUUAACGGAGUGGUGCGGCUUGGACGACCCCAUUGCGUGC

DO1-7
AUAACACMGUGGUAGACUAUUCUUGCGUACGUGCGCGCCCGCGCGCUAUUACGGGAGCACGCCGGCUAACGGAUGUCCUACGCAUGACCUUGCAUUCACCG

DO1-8
UUGACGUUCUUAUCCCGGAACAAGUGGACAGCGGUGGACUGACCGCGCGGUUUAAGAAAAGGUGAUCGCGCUUAUUAACGCCCCCCCAUCCGGACCC

DO1-30

CUUGGUGGCUUCCGAAACCGAACUUUGGGUUUCCAGACCCCAUUAAGAAACACCCACGCGUGUCAUAGUGUUAUCCGAUUGCCACCCCGUCAUACGGCGUA
Δ

DO1-32

☺ Inv ☺

UGCACCAUUCGACGNGCAAGAGAGGGCCCGAGAGACCCUAGAUCUCUCGCGGGAACUGCUGUGAUGAAUUAUUUGUAGGGCGGCAGUCGGAAGUUG

DO1-37

CUANAGGUUGGAUUUUGUAAACCCACCGCGACCAUUGGACAGUGCGUAACAACGUGCUUCCACGCGUGCACGNGNGCAGCGACGUGCCGACCUCCUAUGGA

DO1-40

Δ Inv. * ☺

UACGCAGUAACACCGUCGCCUGCGUCUACCGCGGGUUGGAUUAAGUGCCGAGCACCCACAAAGGCUACAUUUGUAGACAAAGCGGUGCCA

DO1-41

UCGGCUAACUCACCAUUAAGCGMAGCGGGCGGGUUGGAUCCUAAUGCAACUUUUAACGUUGCGGGUUCACCAUGAACGAACGUAGCUUCCCCUAUGA

DO1-47

Δ Δ

AACAGGAUAGCGGAUCUACGUGUUCGCUCCGGAUAGGUUAACUUUGAACAAUGUACACUAGGAUAGCAUUGCGGCCCCUGGGG

DO1-59

☺

AUUGCUGUACGGGCAUAGCCUGAAGCAGAAUGCUCACUGCGGUCCUGCGACUGGACACAGUGCCAGUCCGGCGGUUGCUUAUAGGAGUGGGUUAUAGU

DO1-61

ACUCUCGCUUGCCUGCCAUGAUUCGCGUAAAUUAUAAUCCGGAAGUAUCGAUGCGGGUUCGCCCUUAUUGCAUUAUGAAUACUUGCGCGGAGUACACA

Bel Temporal
Daf nicht geändert werden

34
T. 2

23

⑤

WGL

CAA

1111

9

5

9.10

•

•

ID02-11



AGCAGCUCGCGCCCCACAUCGUAACUCAGCCCGGAUCAGAGACAGUCCACAGUACUGAGACCUCUUCUAGGGUGCGUACUCGUGCGUUAGAAUUACCGG
D02-12
CUGUCGGUACAUUUCUGAGAAAAAAGGUGCNGGAGUAUCGUGGUGCCCGGGCUAGAAUAUUUGGCAACUUCUGGGAGACUCGCGCU

ID02-13

UCGUCCUAUCACCAAGAAUAGAUUCCUAUCACGCGAGAACGAAUAGAGUACUGGUUACCGUUUUCGCUACAGUUUUCGGUUGACUCAUAAGG

D02-14

GUAGCACAUUGUCUCCACACGGCCUCCCUUAGUUAGUCCGAGUGUGACCGUCCUAGGUACCCUUUCGGCAACCCUAUGUGCGCGAUGC

D02-15

ACCCAACUGGGUACGUACCCUCCUUGCCCGCUACGUACUCCGACUGCCACACCCUUUAGCUGACCGGCCACUUCUGGCGGAGGGCGCUUCA
ID02-16
AACUGUGCCAGAGACUAUGUUUAGUUAUCUGGGCUAAGCCCGAUGCAGCAUACACCCUACAGUCUCGGCCCGACCCGUAGGGUUC

D02-17

CGCAUGCUGCUCACGCAUAGACUGCGUGCUGCUAGUCACCGCCUUGCAAUUCCACGGGCACUGCGGUGUGCGGCUCAAGCCGCGACAAC
ID02-18
UUGACGUUCUUAUCCCGMCAAGUGGGACAGCGUGGACUGACCGCGCGGUUJAGAAAAAGGUGAUCGCGCUUUAUACCGCCCAUCGCGGACCC

D02-19

UUUAGCCACGGAACGGAUAAUUGACCUACAUUCGGACGGCCACGGACUAGGAGUUGCAGCUACAGUUUUUUAAGAGCGUAAUUGUGGGGGU
D02-20



GUGAGUUUNCGAUAGUUUGUAGAGCGCCAGCUACGGUACAUCCGGUGCUAUUCUGGAACCCGUGCGGAUUUACCGC AUGUCUCUGAGUUCGCGUAA

D02-22

UCCAGCCCATGCUCUAGUUUGACUUAACCAAGACGGCGAUGCGACUCUAUGCCCCGACCCCCCAUAAUUUGCCCCGUACUACCAAGUGGUUGCCCC

D02-23

GGCAGCUUGCAUUUUCGGAGGCCUAUUGUCUUUUGACGUCUGUAUAACCCACGUUGUCGUGCCGACACCCCUUAGCGAGUACCAACGCCCCUC

D02-24

CUGGGCUAUUCCGAUUGCCCUUUGUUUCAUCGGGCUAUUCCUGGUCAUUACCGUGCGGUAGCAUAUUGCUUGAUGCAUCUUGCUUAUUCGCC

D02-25

AUUGGCCAGAACUAAGGUAGCCCCAAGUUUAAAAGCCUAGGAGCGGAGCAAUUUGAUGCCGGCAUAGCGUUGCGCCACCAUACAUUACU

D02-26

GAUACUCUUAACGUGCUAAAUUGGAGUAACGCCUGUGUAUACACCUCUAGCAUUGGUGACUACGUUUUGACUUAUUGCAUUGCUUAUUCGCC

D02-27

AAGCUUCCACGAGACUCMAUUAUUCUGAUGCCCGACGCAUACACGAGACUACCUUGACCGCGAUUGCGCUUACCGCAUUUAAGUUAAUUGG

DO3-Serie

IDO3-3
AUAACACAAGUGGUAGACUAUUCUUCGGUACGUGCGCCCCCGCGCGGAGACGCGGGCUAACGGAUGUCUCCUACGCAUGUUCUGCAUUCACCG
*
*
IDO3-7
AUAACACAAGUGGUAGACUAUUCUUCGGUACGUGCGCCCCCGG GUUUUACGGGAGCACGCCGCUAACGGAUGUCCCUACGCAUGACCUUUCACCGC

Klon 2

DO3-2
NCANNUCUNCCNCCCUAAGNUUNUUCGAGCUCGGUACC UGCCGAUUACGGCUAAUUG CUGCAGGCAUGCAAGCUUGG
IDO3-10
UGCCGAUUACGGCUAAUUG
DO3-13
UGCCGAUUACGGCUAAUUG

Klon 8

DO3-04
CGGGAUCCUCUAGANUCGAC

Klon 1

IDO3-6
UCUGAUGCCCGCGGUU
DO3-16
CUNGACCGCUAGCGGGU

Klon 3

DO3-11
UUAACAAGCGCCUACGACUUCUCCAUUUGAGCGGGUAGACGUUACGAUUGAGGCUUAGACUNUUAUCCAGCAGCUCGACCUAGCGGGGCCC
DO3-14
UUAACAAGCGCCUACGACUUCUCCAUUUGAGCGGGUAGACGUUACGAUUGAGGCUUAGACUNUUAUCCAGCAGCUCGACCUAGCGGGGCCC

Fig. 8b

5

3-15

Klon 6

DQ3-12

1003-9

003-18

GGCGUA

Belegexemplar
Darf nicht geändert werden

Fig. 9

Konsensus Sequenzen

X ACUAAU X CUUC X GCGAAUUACGGG X GCUAAAUUGC X GAUGUG(U)GCU X
CGCU C C G C CUG
UG A

X = 0 - n Nukleotide oder Spacermoleküle

nmax = 10, 20, 50, 100, 200, 500, oder 1000

X = gleich oder verschieden

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.